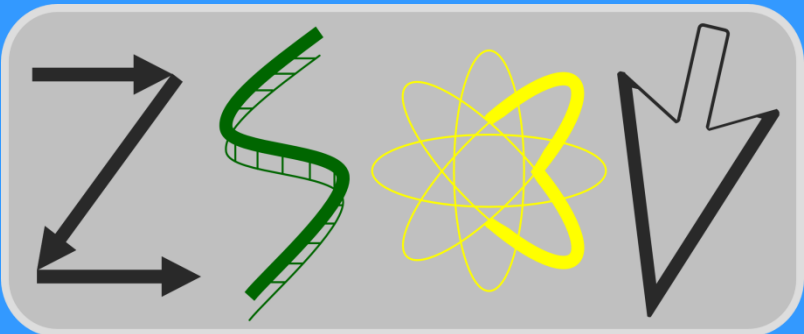
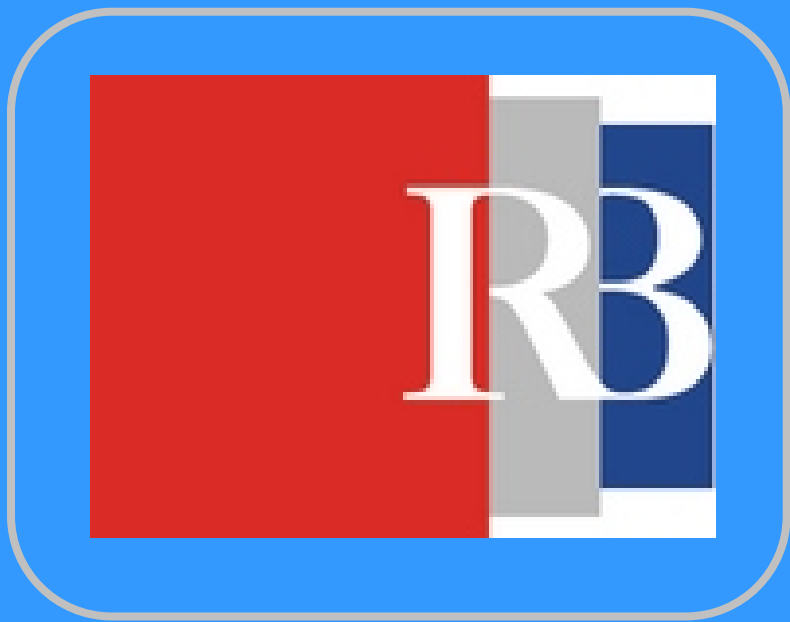


# PUSTOLOVINE NAFTNE MRLJE – KRAJ PUTA!

L. Perić, S. Ravlić, M. Smodlaka Tanković  
Centar za istraživanje mora, Laboratorij za morsku ekotoksikologiju



MORE IS MORE

Jadransko more je najvažniji gospodarski i prirodni resurs Republike Hrvatske, te praćenje njegovog „zdravstvenog“ stanja je prijeko potrebno.



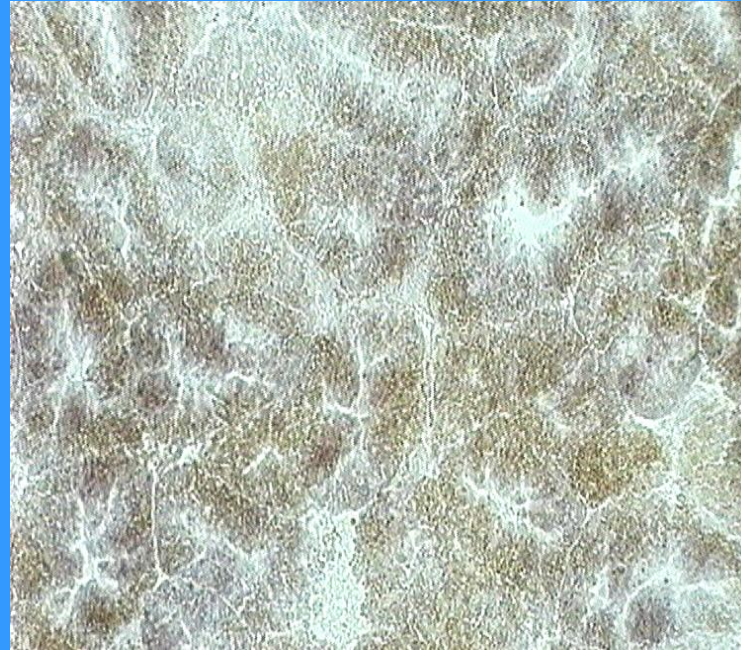
Utječe li kondicija organizma, uvjetovana „dobro odabranim genima“, na odgovor organizma pri različitim uvjetima u moru? Na to, i na mnoga druga pitanja tražimo odgovor prateći utjecaj nafte na vodu i sediment, te istražujući razine biološkog odgovora kod dagnje (*Mytilus galloprovincialis*). Dagnja ima značajnu ekonomsku važnost kao hrana, ali i važnu ulogu kao modelni organizam u studijama utjecaja onečišćenja na more. Zbog sesilnog načina života i hranjenja filtriranjem morske vode, u tkivima dagnje dolazi do koncentriranja onečišćivala. Iz ovih razloga dagnja razvija sustave adaptacije i tolerancije na široki raspon uvjeta.

## Lisosomalne membrane

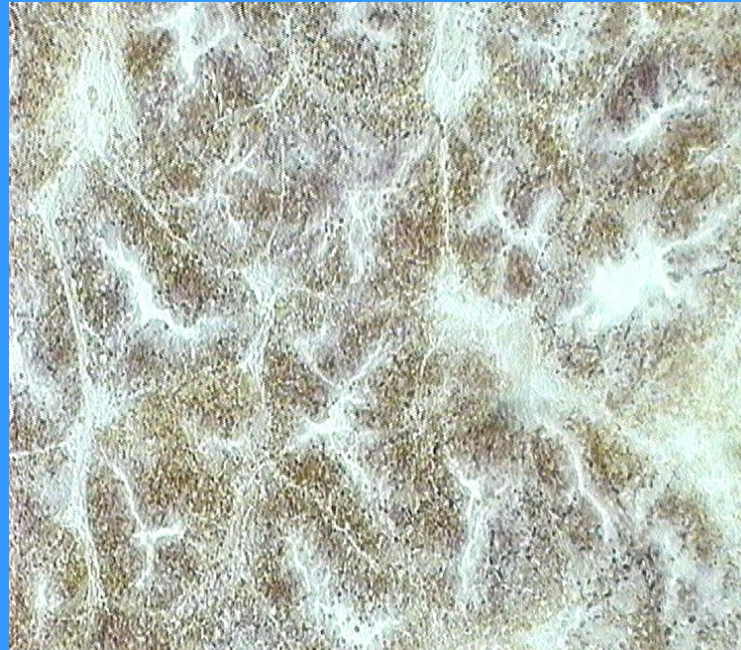
Lizosomi probavne žlijezde dagnje glavno su mjesto akumulacije i detoksifikacije metala i organskih onečišćivača. Njihovim nakupljanjem unutar lizosoma epitelnih stanica tubula probavne žlijezde dolazi do destabilizacije membrane lizosoma i difuzije lizosomalnih hidrolitičkih enzima u citosol. Brojni laboratorijski pokusi i terenska istraživanja pokazala su da stabilnost lizosomalne membrane predstavlja glavni lizosomalni odgovor na prisustvo mnogih onečišćivača u moru, uključujući i PAH-ove (Aarab et al, 2008), pa se stoga ovaj parametar smatra pouzdanim biomarkerom općeg stresa (Domouhtsidou et al, 2004; Petrović et al, 2001).

Metoda određivanja stabilnosti lizosomalne membrane temelji se na praćenju vremena tretmana serijskih kriostatskih prereza probavne žlijezde dagnje koje je potrebno da bi se tijekom inkubacije u destabilizirajućem (citratnom, pH 4,5) puferu umjetno destabilizirala membrana. Za to vrijeme, supstrat za enzim N-acetyl-β-hexosaminidaze (EC 3.2.1.52) penetrira kroz membranu u lizosom i reagira sa lizosomalnim enzimom. Reakcija postaje vidljiva nakon bojanja preparata diazonijevom soli. Membrana lizosoma je destabilizirana nakon što je postignut najjači intenzitet obojenja, koji odgovara najvećoj aktivnosti enzima (Moore, 1976).

a)



b)



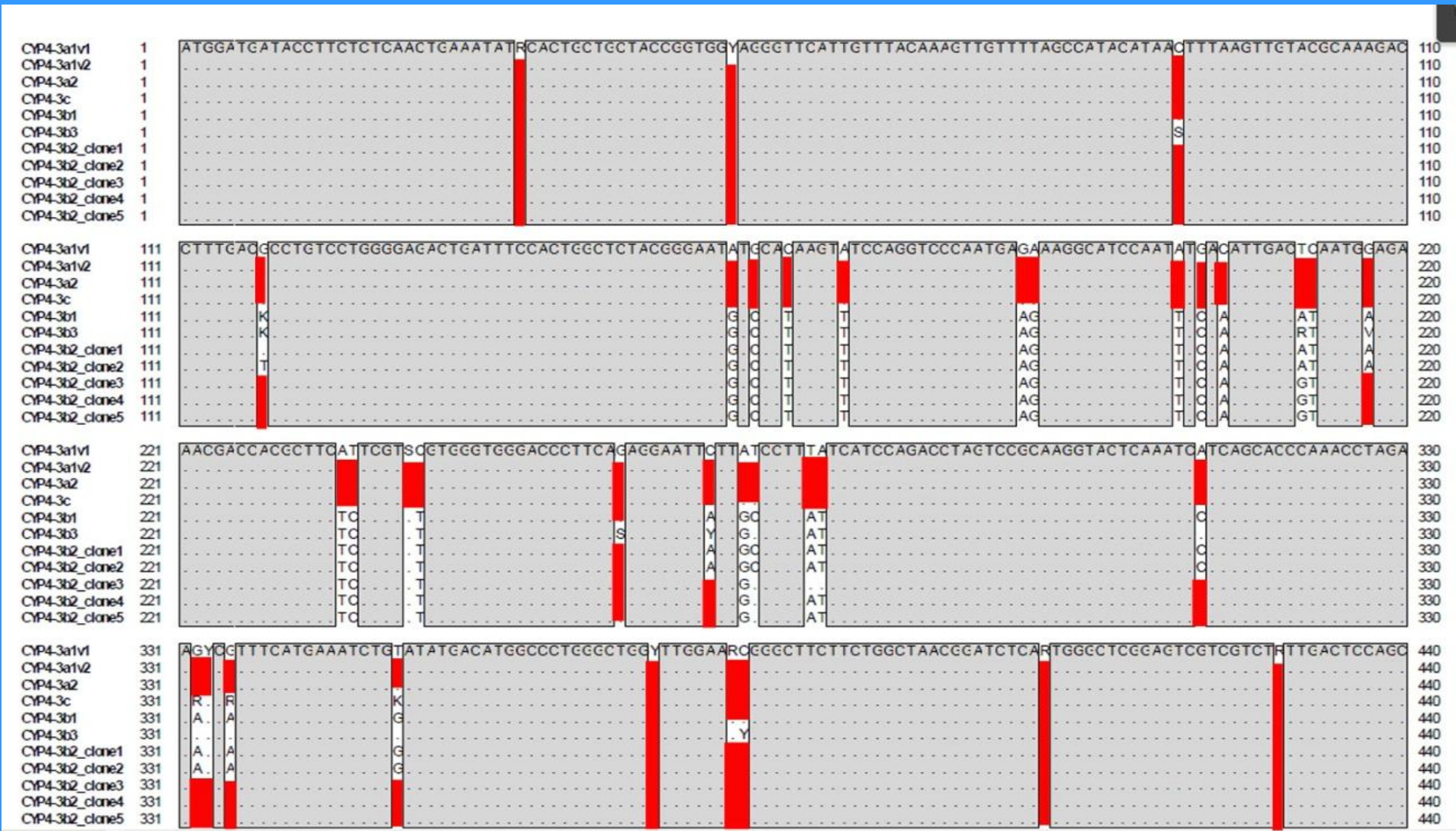
Opis slike - Citokemijska detekcija enzima N-acetyl-β-hexosaminidaze u kriostatskim presjecima probavne žlijezde dagnje nakon a) 5 i b) 15 inkubacije u citratnom (destabilizirajućem) puferu. PT – Probavni tubuli, L - Lumen probavnih tubula, Strelica - lizosomi

### Zaključak

Vrijeme koje je potrebno da se postigne maksimalni intenzitet produkta citokemijske reakcije je viši u školjaka sa postaje opterećene onečišćivačima u usporedbi s kontrolom.

## Citokrom P450 - Svaka dagnja se razlikuje (više ili manje)...

Enzimi citrokroma P450 uključeni su u mnoštvo metaboličkih i biosintetskih procesa. Geni citrokroma sačinjavaju jednu od najvećih obitelji gena, zastupljenu u svim carstvima, od bakterija do biljaka i životinja. Do danas je identificirano gotovo 10 000 P450 gena (Nelson i dr., 1996). Postoje dvije osnovne funkcije ovih enzima: metabolizam spojeva stranih organizmu (ksenobiotici) kojim se oni degradiraju ili izlučuju iz organizma, i biosinteza molekula koje održavaju homeostazu organizma (hormoni, steroli, vitamini)



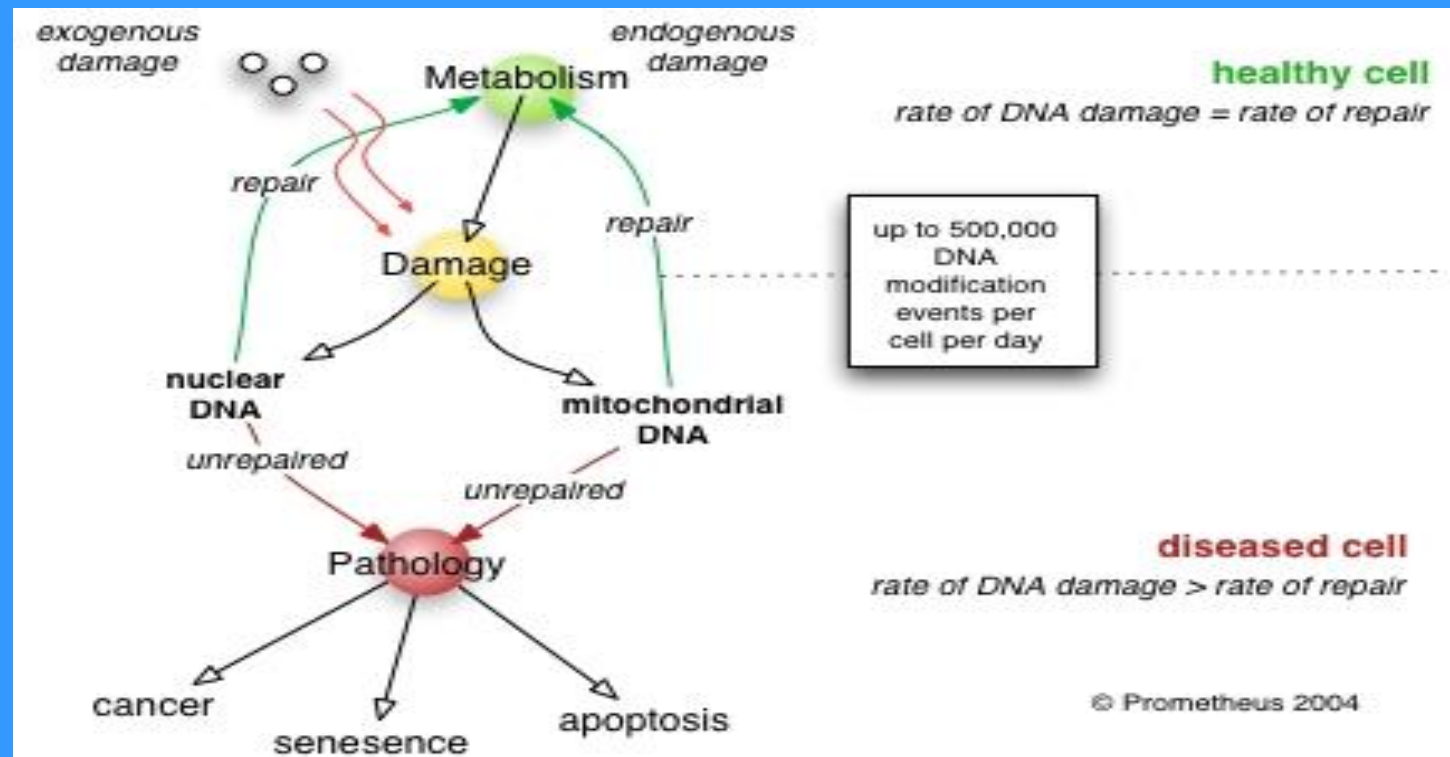
Nukleotidno sravnjnje Cyp4 cDNA sekvenci dagnje (*Mytilus galloprovincialis*). Na slici je prikazan konsenzusni nukleotidni slijed jedanaest cDNA uključujući moguće genske varijante (aleli). Identični nukleotidi označeni su točkicama i osjenčani sivo. Nuklotidni polimorfizam (varijacije u genskom slijedu) označen je crvenom bojom.

Svi P450 enzimi pokazuju sličnost u strukturi i općem mehanizmu djelovanja, međutim, postoji značajna razlika u funkciji individualnih enzima kao i u njihovoj strukturi i osobitostima. Dio varijabilnosti određen je okolišem zbog pratećeg priliva različitih ksenobiotika i prehrambenih proizvoda koji uzrokuju indukciju ili inhibiciju različitih izoformi P450 enzima (Gonzales et al.,1994). Razine pojedinačnih enzima Citrokroma P450 važne su odrednice bioakumulacije i krajnje osjetljivosti organizma na prisutnost PAHova u okolišu. Mutacije u genima citrokroma uzrokuju stvaranje enzimskih produkata sa ukinutom, oslabljenom, izmijenjenom ili povišenom učinkovitošću (Ingelman – Sundberg, 1999; Oscarson, 1997).

## Popravak DNA

Oštećenja DNA nastaju posredno i neposredno raznim onečišćivačima koji su uneseni u morski ekosustav (Chang i dr. 1994). Oštećenja nije moguće izbjeći, u svakom organizmu oštećenja DNA nastaju spontano uslijed fiziološke i metaboličke aktivnosti.

Organizmi posjeduju mehanizam koji uklanjaju nastala oštećenja, u nekim situacijama aktivnost mehanizma popravka može biti narušena. Poznato je da mnogi onečišćivači djeluju baš na mehanizam popravka tako da smanjuju ili inhibiraju njegovu aktivnost što dovodi do akumulacije oštećenja DNA u organizmu i konačno do smrti organizma.

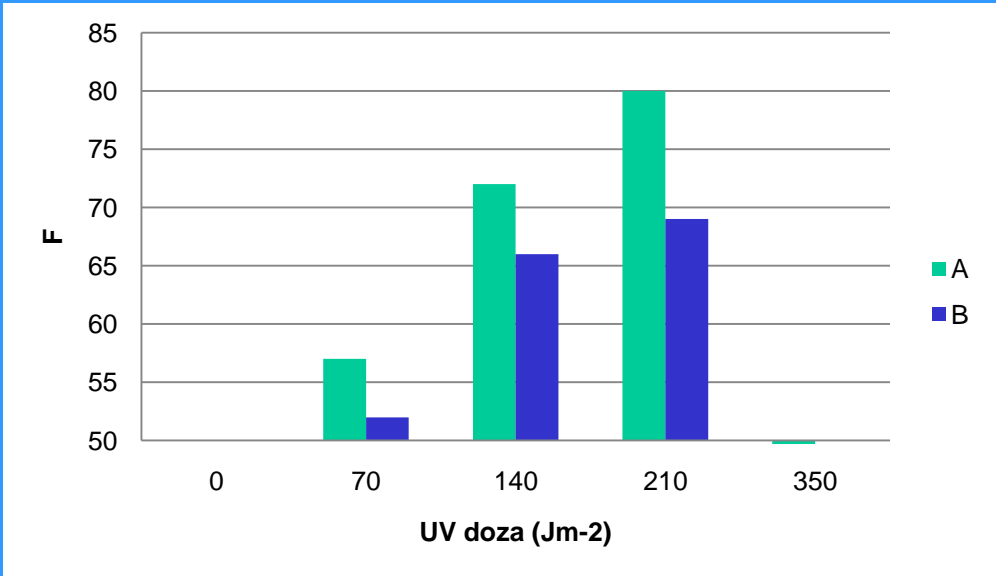


Očuvanje integriteta DNA je ključna uloga mehanizma popravka DNA (Sinha i Häder 2002). Omjer nastalih oštećenja i popravak tih istih oštećenja djeluje na integritet DNA a što je on stabilniji to je organizam u boljem fiziološkom stanju.

Učinkovitost popravka DNA je jedan parametar koji može proširiti razumijevanje utjecaja onečišćivača na morske organizme u ekosustavu.

### Metodologija:

Za određivanje učinkovitosti popravka DNA u morskim beskralješnjacima koristi se 3D test (Damaged DNA Detection assay). Ovaj test mjeri količinu popravljenog DNA koji se obilježava fluorescentnom probom. Prednosti ove metode su korištenje vrlo male količine uzorka i mogućnost obrade velikog broja uzoraka.



Na slici je prikazana učinkovitost popravka DNA kod povećanja količine oštećenja u dvije različite jedinke.

### Literatura:

King AJ, Redman JW, Zhou JL (2004) Dynamic behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons in Brighton marina, UK. Mar Poll Bull 48: 229-239  
Aarab, N., Pampanin, D.M., Nævdal, A., Øysæd, K.B., Gastaldi, L., Bechmann, R.K. Histopathology alterations and histochemistry measurements in mussel, *Mytilus edulis* collected offshore from an aluminium smelter industry (Norway) (2008) *Marine Pollution Bulletin*, 57 (6-12),569-574.  
Domouhtsidou, G.P., Dailianis, S., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K.Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.), as biomarkers: Combination with trace metal concentrations (2004) *Marine Pollution Bulletin*, 48 (5-6), 572-586.  
Moore, M.N. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress (1976) *Cell and Tissue Research*, 175 (3), 279-287  
Petrović, S., Ozretić, B., Krajnović-Ozretić, M., Bobinac, D. Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) as biomarkers in a field study (2001) *Marine Pollution Bulletin*, 42 (12), 1373-1378.  
Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. 1996. P-450 superfamily: update on newsequence, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics 6:1–42.  
Gonzales, F. J., Gelboin, H. V., Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. 1994. Drug Metab Rev. 26, 165 – 183.  
Ingelman – Sundberg, M., Oscarson, M., McLellan, R. A., Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. 1999. Trends Pharmacol. Sci. 20, 342 – 349.  
Oscarson, M., Hildebrand, M., Johansson, I., Ingelman – Sundberg, M., A combination of mutations in the CYP2D6\*17 (CYP2D6Z) allele causes alternations in enzyme function. 1997. Mol. Pharmacol. 52, 1034 – 1040.  
Chang, LW, Hsia SMT, Chan PC and Hsieh LL (1994) Macromolecular adducts: biomarkers for toxicity and carcinogenesis. Annu Rev Pharmacol Toxicol 34 41-67  
Sinha, R. P., & Häder, D. P. UV-induced DNA damage and repair: A review. *Photochemical and Photobiological Sciences* 1, 225–236 (2002)

Posebna zahvala ide našoj metorici dr.sc. Maji Fafandel i voditeljici našeg laboratorija dr.sc. Nevenki Bihari.